

JP2001245675

**Title:**  
**TUMOR ANTIGEN**

**Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new tumor antigen which is useful in a specific immunotherapy for patients who have adenocarcinoma or epithelial carcinoma, e.g. large bowel carcinoma or pulmonary carcinoma, and is recognized by cytotoxic T cell.

**SOLUTION:** A peptide recognized by HLA-A 2402 restrictive cytotoxic T cell and encoded by PI-9 gene, a polynucleotide or its complementary chain encoding the peptide, a recombinant vector containing the polynucleotide, a transformant containing the vector, an antigen against the peptide, a compound interacting with them, a cytotoxic T cell inducer comprising the peptide and a pharmaceutical composition containing at least one kind of them are obtained and a method for producing the peptide, a method for screening out compounds interacting with the peptide or polynucleotide, a diagnostic means comprising assaying the peptide or polynucleotide and a method of induction for cytotoxic T cell using the peptide are provided.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-245675  
(P 2 0 0 1 - 2 4 5 6 7 5 A)  
(43) 公開日 平成13年9月11日(2001.9.11)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C12N 15/09	ZNA	A61K 35/12	
A61K 35/12		39/00	H
38/00		39/395	E
39/00		48/00	
39/395		A61P 35/00	

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全14頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-393047 (P 2000-393047)	(71) 出願人	596094371 伊東 恭悟 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9
(22) 出願日	平成12年12月25日(2000.12.25)	(72) 発明者	伊東 恭悟 佐賀県三養基郡基山町けやき台2丁目25番地9号
(31) 優先権主張番号	特願平11-374322	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆 (外1名)
(32) 優先日	平成11年12月28日(1999.12.28)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 腫瘍抗原

(57) 【要約】

【課題】 腺癌や上皮性の癌、例えば大腸癌や肺癌の患者の特異的免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞による認識性を有する新規な腫瘍抗原を提供すること。

【解決手段】 H L A - A 2 4 0 2 拘束性細胞傷害性T細胞により認識される、P I - 9 遺伝子がコードするペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該ベクターを含む形質転換体、該ペプチドに対する抗体、これらに相互作用を有する化合物、該ペプチドからなる細胞傷害性T細胞誘導剤、これらの1種以上を含む医薬組成物、ならびに該ペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドを検定することからなる診断手段、該ペプチドを用いる細胞傷害性T細胞の誘導方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群より選ばれるペプチド；

①配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3または

配列番号4に記載のアミノ酸配列で示されるペプチド、

②前記①のペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチド、

③前記①のペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、および

④前記①から③のペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入などの変異あるいは誘発変異を有するペプチド。

【請求項2】 下記の群より選ばれるペプチドであって、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド；

①配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列で示されるペプチド、

②前記①のペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチド、

③前記①のペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、および

④前記①から③のペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入などの変異あるいは誘発変異を有するペプチド。

【請求項3】 配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド。

【請求項4】 少なくとも請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドからなる医薬。

【請求項5】 請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも1つのペプチドを癌治療有効量含んでなる癌治療に用いる医薬組成物。

【請求項6】 請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドから選ばれる少なくとも1つのペプチドと、公知の腫瘍抗原ペプチドから選ばれる少なくとも1つの腫瘍抗原ペプチドとを癌治療有効量含んでなる癌治療に用いる医薬組成物。

【請求項7】 請求項6に記載の医薬組成物であって、該医薬組成物に含まれる公知の腫瘍抗原ペプチドが、1 c k遺伝子およびs r cファミリー遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、SART-1遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、SART-3遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、およびサイクロフィリンB遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドから選ばれる少なくとも1つの腫瘍抗原ペプチドである医薬組成物。

【請求項8】 請求項7に記載の医薬組成物において、1 c k遺伝子およびs r c遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドが、TFDYLRSLV (1 c k<sub>486-494</sub>)、DYLRSLVLEDF (1 c k<sub>488-497</sub>)、TF

EYLQAFLEDYF (s r c<sub>511-523</sub>)、TFEYIQSFLEDYF (y e s<sub>508-520</sub>)、TFEYIQSVLDDFY (h c k<sub>503-515</sub>)、TFEFLQSVLEDFY (b l k<sub>482-494</sub>)から選ばれるものであり、SART-1遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドがEYRGFTQDF (SART-1<sub>690-698</sub>)であり、SART-3遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドがVYDYNCHVDL (SART-3<sub>109-118</sub>)またはAYIDFEMKI (SART-3<sub>315-323</sub>)であり、サイクロフィリンB遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドがKFH RVIKDF (Cyclophilin B<sub>84-92</sub>)またはDFMIQGGDF (Cyclophilin B<sub>91-99</sub>)である医薬組成物。

【請求項9】 前記医薬組成物が癌ワクチンである請求項5から8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項10】 少なくとも請求項2または3に記載のペプチドからなる細胞傷害性T細胞の誘導剤。

【請求項11】 請求項2または3に記載のペプチドを用いた細胞傷害性T細胞の誘導方法。

【請求項12】 請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補鎖、または該ポリヌクレオチドもしくはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドから選ばれるポリヌクレオチド。

【請求項13】 請求項12に記載のポリヌクレオチドの少なくとも15個の塩基配列で示され、転写によって発現されるペプチドが少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有する、ポリヌクレオチド。

【請求項14】 請求項12または13のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項15】 請求項14に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項16】 請求項15に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドの製造方法。

【請求項17】 請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項18】 請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチドと相互作用して少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物および/または請求項12または13に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求項1から3のいずれか1項に記載のペプチド、請求項12または13に記載のポリヌクレオチド、請求項14に記載のベクター、請求項15に記載の形質転換体、または請求項17に記載の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 19】 請求項 18 に記載のスクリーニング方法により得られた化合物。

【請求項 20】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの少なくとも HLA-A2402 拘束性細胞傷害性 T 細胞による認識性を増強する化合物、または請求項 12 または 13 に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物。

【請求項 21】 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド、請求項 12 または 13 に記載のポリヌクレオチド、請求項 14 に記載のベクター、請求項 15 に記載の形質転換体、請求項 17 に記載の抗体、および請求項 19 または 20 に記載の化合物のうちの少なくとも 1 つを癌治療有効量含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物。

【請求項 22】 個体における請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断手段であって、(a) 該ペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および/または (b) 個体由来の試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む診断手段。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規な腫瘍抗原に関し、さらに詳しくは腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞による認識性を有するペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、該ペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ペプチドからなる細胞傷害性 T 細胞誘導剤、これらの 1 種以上を含む医薬組成物、ならびに該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドを検定することからなる診断手段、該ペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法、および該ペプチドを用いる細胞傷害性 T 細胞の誘導方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生体における癌の排除には免疫系、特に細胞傷害性 T 細胞が重要な役割を果たしている。癌患者の腫瘍局所には癌細胞に対して傷害活性を示す細胞傷害性 T 細胞の浸潤が認められている (Arch. Surg., 126:200-205, 1990)。この腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞の標的分子 (腫瘍抗原) の発見は、メラノーマにおいて初めてなされた。腫瘍細胞内で生成された腫瘍抗原は、細胞内で分解されて 8~11 個のアミノ酸からなるペプチド (腫瘍抗原ペプチド) になり、主要組織適合性抗原であるヒト白血球抗原 (HLA) 分子と結合して腫瘍細胞表面上に提示される。

【0003】HLA は細胞膜抗原であり、ほとんど全ての有核細胞上に発現している。HLA はクラス I 抗原と

クラス II 抗原に大別されるが、細胞傷害性 T 細胞により抗原ペプチドとともに認識される HLA はクラス I 抗原である。HLA クラス I 抗原はさらに HLA-A、B、C などに分類され、その遺伝子には多型が存在することが報告されている。HLA-A24 対立遺伝子 (allele) は、日本人の人口の約 60% (多くは、その 95% の遺伝型が A2402 である)、コーカサス人の 20%、アフリカ人の 12% でみられる。

【0004】この HLA に結合可能な腫瘍抗原ペプチドには、HLA の型 (type) ごとにその配列にモチーフ (規則的配列) があることが知られている。細胞傷害性 T 細胞はこの腫瘍抗原ペプチドと HLA との複合体を認識して腫瘍細胞を傷害する。ここにおいて、腫瘍抗原とは腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または活性化しうる、腫瘍細胞が有する蛋白質またはペプチドを意味する。また腫瘍抗原ペプチドとは、該腫瘍抗原が腫瘍細胞内で分解されて生じるペプチドであり、HLA 分子と結合して細胞表面上に提示されることにより腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または活性化しうるペプチドを意味する。さらに、腫瘍抗原が有する腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導および/または活性化しうるアミノ酸配列の部位を腫瘍抗原エピトープ (腫瘍抗原決定基) という。

【0005】腫瘍抗原ペプチドと HLA の複合体を認識することにより活性化された細胞傷害性 T 細胞の腫瘍細胞を傷害するメカニズムには 2 つの経路が存在することが知られている。一つは当該細胞傷害性 T 細胞表面上に Fas リガンドが発現され、腫瘍細胞表面上に存在する Fas 抗原と結合することにより Fas 抗原を介して腫瘍細胞のアポトーシス (apoptosis) を誘導して細胞死に至らしめる経路である。他の一つは、当該細胞傷害性 T 細胞が、保有する細胞傷害性顆粒を放出し、該顆粒中に含まれるパーフォリンにより腫瘍細胞の膜に孔 (Pore) を形成し、該顆粒中のグランザイム等の化学物質を腫瘍細胞内に送達することによりアポトーシス (apoptosis) を誘導する経路である。

【0006】近年、細胞傷害性 T 細胞による認識性を有する腫瘍抗原をコードする多くの遺伝子が、ヒトの癌細胞の cDNA から同定されている (Science, 254:1643~1647, 1991) (J. Exp. Med., 183:1185~1192, 1996) (J. Immunol., 163:4994~5004, 1999)。これらは、HER/neu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:432~436, 1995)、変異 cdk (Science, 269:1281~1284, 1995)、そして変異 CASP-8 (J. Exp. Med., 186:785~793, 1997) 等を含み、増殖性細胞および悪性形質転換体中に含まれる。

【0007】腫瘍抗原の中で MAGE (メラノーマ抗

原)ファミリー(Cancer Res., 55:3478~3482, 1995)とSART1(J. Exp. Med., 187:277~288, 1998)(Int. J. Cancer, 81:459~466, 1999)等のいくつかの遺伝子産物は、悪性細胞にほぼ選択的に発現しており、正常細胞や正常組織における発現はほとんど認められない。しかし、多くのメラノーマ特異的な腫瘍抗原、例えばMART-1/melan A, gp100、およびチロシナーゼ等は、正常メラニン細胞にも共通に存在する(Oncogene Res., 1:357~374, 1987)。それゆえ、腫瘍抗原の多くは、真に腫瘍特異的な腫瘍抗原というのではなく、むしろそれらはいくつかの正常細胞や組織で発現する自己抗原と言える。

【0008】現在欧米では、腫瘍抗原ペプチドを投与することにより癌患者の体内の細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法の開発がなされており、メラノーマ特異的な腫瘍抗原については臨床試験における成果が報告されている。例えば、メラノーマ抗原gp100ペプチドをメラノーマ患者に皮下投与し、インターロイキン-2(IL-2)を静脈注射投与すると、42%の患者で腫瘍の縮小が認められている(Nature Medicine, 4:321, 1998)。このように腫瘍抗原は、ワクチンとして利用することにより、有効な癌治療効果を期待できる。

【0009】しかしながら、同定されている腫瘍抗原はそのほとんどがメラノーマ由来であり、発病頻度の高い上皮性の癌や腺癌由来の腫瘍抗原についての報告は少ない。既存の三大癌治療(手術療法、化学療法、および放射線治療)での1998年における5年生存率は全癌で41%であるが、これ以上生存率を増加させることは現状では難しく、上記三大治療法に加え新たな治療法の開発が望まれている。

【0010】本発明者は、既に1ck遺伝子のコードするペプチドが大腸癌細胞と小細胞性肺癌細胞において異常に発現しており、腫瘍抗原としてHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞により認識されることを見出し、該ペプチドの癌治療における有用性を見出している(特願平11-222101号)。

【0011】一方、PI-9(proteinase inhibitor 9)は、ヒトセリンプロテアーゼ阻害剤(serine protease inhibitor)の1つとして報告されており(J. Biol. Chem., 271:27802~27809, 1996)、細胞傷害性T細胞が標的腫瘍細胞を特異的に認識し細胞傷害活性を示す時に、細胞傷害性T細胞から放出されるセリンプロテアーゼであるグランザイムB(granzyme B)に対する阻害剤として働くことが知られている。従って、腫瘍細胞においてPI-9は細胞傷害性T細胞による生体防御システムを回避するた

めに作用すると考えられる(Mol. Cell Biol., 18:6387~6398, 1998)。しかし、腫瘍細胞におけるPI-9の腫瘍抗原としての機能については、全く報告されていない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】腫瘍抗原として作用する可能性のあるペプチドについてはいくつか報告がなされているものの、癌の多様性を考えた場合、全ての癌細胞において同一の腫瘍抗原が同程度発現されているとは考えられない。もちろん、単一の腫瘍抗原を用いて細胞傷害性T細胞を活性化させる癌ワクチン療法によっても、該腫瘍抗原を有する癌の治療効果は得られる。しかし、癌の治療において特異的な細胞傷害性T細胞を惹起し、かつ癌の多様性に対応して高い治療効果を得るためには、新たな腫瘍抗原を発見し利用することが重要である。すなわち本発明が解決しようとする課題は、腺癌、および上皮性の癌、例えば大腸癌や肺癌の患者の特異的な免疫療法に有用な、細胞傷害性T細胞による認識性を有する新規な腫瘍抗原を見出し提供することである。

【0013】具体的には、少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞により認識されるペプチドを見出すことである。詳しくは、HLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖であるポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む質質転換体、該ペプチドに対する抗体、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物、該ペプチドからなる細胞傷害性T細胞誘導剤、これらの1種以上を含む医薬組成物、ならびに該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドを検定することからなる診断手段、該ペプチドの製造方法、該ペプチドまたは該ポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法、および該ペプチドを用いる細胞傷害性T細胞の誘導方法、を提供することである。

【0014】

【解決のための手段】課題解決のため本発明者は、食道癌患者から確立したHLA-A24と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化されるHLA-A2402拘束性腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞(KE4-CTL)を用い、この腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、KE4腫瘍細胞株のcDNAライブラリーから同定し、さらにHLA-A2402拘束性細胞障害性T細胞により認識される、該腫瘍抗原のエピトープ(抗原決定基)を有するペプチドを見出し、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定することにより、本発明を完成した。

【0015】すなわち、本発明は、(1)下記の群より選ばれるペプチド; ①配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

で示されるペプチド、②前記①のペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチド、③前記①のペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、および④前記①から③のペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入などの変異あるいは誘発変異を有するペプチド；(2) 下記の群より選ばれるペプチドであって、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド；①配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列で示されるペプチド、②前記①のペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチド、③前記①のペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、および④前記①から③のペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入などの変異あるいは誘発変異を有するペプチド；(3) 配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を有し、かつ少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有するペプチド；(4) 少なくとも前記(1)から(3)のいずれかのペプチドからなる医薬；(5) 前記(1)から(3)のいずれかのペプチドから選ばれる少なくとも1つのペプチドを癌治療有効量含んでなる癌治療に用いる医薬組成物；(6) 前記

(1)から(3)のいずれかのペプチドから選ばれる少なくとも1つのペプチドと、公知の腫瘍抗原ペプチドから選ばれる少なくとも1つの腫瘍抗原ペプチドとを癌治療有効量含んでなる癌治療に用いる医薬組成物；(7) 前記(6)の医薬組成物であって、該医薬組成物に含まれる公知の腫瘍抗原ペプチドが、Ick遺伝子およびsrcファミリー遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、SART-1遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、SART-3遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、およびサイクロフィリンB遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドから選ばれる少なくとも1つの腫瘍抗原ペプチドである医薬組成物；(8) 前記(7)の医薬組成物において、Ick遺伝子およびsrc遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドが、TFDYLRSL(Ick<sub>486-494</sub>)、DYLRSLVLEDF(Ick<sub>488-497</sub>)、TFEYLQAFLEDYF(src<sub>511-523</sub>)、TFEYIQSFLEDYF(yes<sub>508-520</sub>)、TFEYIQSVLDDFY(hck<sub>503-515</sub>)、TFEFLQSVLEDFY(blk<sub>482-494</sub>)から選ばれるものであり、SART-1遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドがEYRGFTQDF(SART-1<sub>690-698</sub>)であり、SART-3遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドがVYDYNCHVDL(SART-3<sub>109-118</sub>)またはAYIDFEMKI(SART-3<sub>15-323</sub>)であり、サイクロフィリンB遺伝子由来の腫瘍抗原ペ

チドがKFHRVVKDF(Cyclophilin B<sub>84-92</sub>)またはDFMIQGGDF(Cyclophilin B<sub>91-99</sub>)である医薬組成物；

(9) 前記医薬組成物が癌ワクチンである前記(5)から(8)のいずれかの医薬組成物；(10) 少なくとも前記(2)または(3)のペプチドからなる細胞傷害性T細胞の誘導剤；(11) 前記(2)または(3)のペプチドを用いた細胞傷害性T細胞の誘導方法；(12) 前記(1)から(3)のいずれかのペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補鎖、または該ポリヌクレオチドもしくはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチドから選ばれるポリヌクレオチド；(13) 前記(12)のポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも15個の塩基配列で示され、転写によって発現されるペプチドが少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を有する、ポリヌクレオチド；(14) 前記(12)または(13)のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター；(15) 前記(14)の組換えベクターで形質転換された形質転換体；(16) 前記(15)の形質転換体を培養する工程を含む、前記(1)から(3)のいずれかのペプチドの製造方法；(17) 前記(1)から(3)のいずれかのペプチドを免疫学的に認識する抗体；(18) 前記(1)から(3)のいずれかのペプチドと相互作用して少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物および/または前記(12)もしくは(13)のポリヌクレオチドポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物のスクリーニング方法であって、前記(1)から(3)のいずれかのペプチド、前記(12)または(13)のポリヌクレオチド、前記(14)のベクター、前記(15)の形質転換体、または前記(17)の抗体のうちの少なくとも1つを用いることを特徴とするスクリーニング方法；(19) 前記(18)のスクリーニング方法により得られた化合物；(20) 前記(1)から(3)のいずれかのペプチドの少なくともHLA-A2402拘束性細胞傷害性T細胞による認識性を増強する化合物、または、前記(12)または(13)のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物；(21) 前記(1)から(3)のいずれかのペプチド、前記(12)または(13)のポリヌクレオチド、前記(14)のベクター、前記(15)の形質転換体、前記(17)の抗体、および前記(19)または(20)の化合物のうちの少なくとも1つを癌治療有効量含有することを特徴とする癌治療に用いる医薬組成物；(22) 個体における前記(1)から(3)のいずれかのペプチドの発現または活性に関連した疾病の診断手段であって、(a) 該ペプチドをコードしているポリヌクレオチド、および/または(b) 個体由来の試料中の該ペプチドをマーカーとして分析することを含む診断

手段；を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】（P I - 9 遺伝子の同定）本発明者は、日本人の多数においてみられる H L A - A 分子の型である H L A - A 2 4 に着目し、この H L A - A 2 4 と腫瘍抗原ペプチドとを認識して活性化される H L A - A 2 4 0 2 拘束性腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞（K E 4 - C T L）を食道癌患者から確立した（I n t . J . C a n c e r , 8 1 : 4 5 9 - 4 6 6 , 1 9 9 9）。この細胞傷害性 T 細胞をエフェクターとして使用し、この細胞を活性化しうる腫瘍抗原を、遺伝子発現クローニング法を用いて、K E 4 腫瘍細胞株の c D N A ライブラリーから同定した。細胞傷害性 T 細胞（C y t o t o x i c T L y m p h o c y t e ; 以下、C T L と略すこともある）の活性化の判定は、E L I S A キットを用いて、該 C T L から産生されるインターフェロン- $\gamma$ （I F N -  $\gamma$ ）を測定することにより行った。

【0017】その結果、H L A - A 2 4 拘束性 K E 4 - C T L によって認識される c D N A クローンの 1 つの塩基配列が 2 7 9 2 塩基（b p）長であり、かつ P I - 9 蛋白質のアミノ酸配列に対応する P I - 9 遺伝子の塩基配列であるポジション 1 1 4 - 1 2 4 4 と 1 0 0 % 相同性を有することを見出した。すなわち、P I - 9 遺伝子が、食道癌患者から得られた H L A - A 2 4 0 2 拘束性の腫瘍特異的 C T L により認識される腫瘍エピトープをコードすることを見出した。

【0018】（ペプチドと分析）H L A - A 2 4 0 2 分子への結合能を有する P I - 9 由来ペプチドを得るために、H L A - A 2 4 に結合しうるモチーフ（規則的配列）を有するペプチドについて文献検索し、得られたモチーフに基づいて P I - 9 遺伝子産物のアミノ酸配列（J . B i o l . C h e m . , 2 7 1 : 2 7 8 0 2 ~ 2 7 8 0 9 , 1 9 9 6）から、1 3 種の異なる 8 ~ 1 0 m e r のペプチドを設計し合成した。

【0019】各ペプチドの C T L 活性化作用は、C T L が産生する I F N -  $\gamma$  を指標として測定することにより行った。これらのペプチドは全て C T L の I F N -  $\gamma$  産生を増強した（図 1 参照）。特に 4 つのペプチド、P I 9 - 3（R F C A D H P F L ; 配列番号 1）、P I 9 - 4（A F Q Q G K A D L ; 配列番号 2）、P I 9 - 8（Q Y L L R T A N R L ; 配列番号 3）および P I 9 - 1 1（T F A I R L L K I L ; 配列番号 4）は、検討に用いた複数の C T L 亜株（s u b l i n e）において、強い C T L 活性化作用を示した。用いた C T L 亜株は、K E 4 - C T L を親株として限界希釈培養によって得た C T L である。一方、陰性対照として用いた H I V（H u m a n I m m u n o d e f i c i e n c y V i r u s）由来の H L A - A 2 4 結合モチーフを有するペプチドでは、I F N -  $\gamma$  産生は全く見られなかった。このことから、上記 1 3 種類のペプチドは、いずれも H L A

- A 2 4 拘束性に C T L を活性化する腫瘍抗原としての作用を有するものであることが確認できた。また、P I 9 - 3 および P I 9 - 4 の C T L 活性化作用は、濃度依存的であり、それぞれ 1 0 n M、1  $\mu$  M 程度で認められた（図 2 参照）。

【0020】また、C T L の亜株の種類により、ペプチドによる活性化の程度が異なることが判明した。例えば、P I 9 - 3 は亜株 # 2 および亜株 # 3 を活性化して各亜株からの I F N -  $\gamma$  産生を増強したが、亜株 # 1 は活性化しなかった。P I 9 - 4 は亜株 # 1 および亜株 # 2 を強く活性化したが、亜株 # 3 の活性化の程度は弱かった。すなわち、癌患者の C T L は複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であり、この複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団である癌患者の C T L を活性化するには、1 種類の腫瘍抗原ペプチドの刺激でもよいが、複数の腫瘍抗原ペプチドを組合せて用いて刺激すれば、より高い効果が得られると考えられる。

【0021】（P I - 9 m R N A の検出）種々の癌細胞における m R N A レベルでの P I - 9 の発現をノザンブロット法または R T - P C R 法により分析した。食道癌、胃癌、卵巣癌、口腔癌の細胞株で m R N A が検出された。特に、食道癌では分析に用いた 5 例のすべてに P I - 9 m R N A が検出された。

【0022】（ペプチドによる細胞傷害性 T 細胞の誘導）本発明のペプチド、P I 9 - 3（配列番号 1）または P I 9 - 4（配列番号 2）を用いて、大腸癌患者から得た末梢血単核球（P B M C）から、P I - 9 蛋白質を発現させた腫瘍細胞株（K E 4、S W 4 8 0 および C O L O 2 0 1）に対する H L A - A 2 4 拘束性の C T L を誘導する活性について試験した。

【0023】放射線照射した自己の P B M C を抗原提示細胞（A n t i g e n P r e s e n t i n g C e l l ; 以下、A P C と略称することもある）として用い、ペプチド P I 9 - 3（配列番号 1）または P I 9 - 4（配列番号 2）で 3 回 i n v i t r o において刺激した大腸癌患者由来の P B M C は、H L A - A 2 4 腫瘍細胞（C O L O 2 0 1）には反応せず、H L A - A 2 4 + 腫瘍細胞（K E 4 および S W 4 8 0）に反応し、その結果 I F N -  $\gamma$  の産生が増強された（図 3 参照）。すなわち、これら 2 つのペプチドは、H L A - A 2 4 拘束性の C T L を活性化しうることが判明した。

【0024】また、P I 9 - 8（配列番号 3）および P I 9 - 1 1（配列番号 4）についても、上記同様の検討を行ったところ、大腸癌患者から得た P B M C から、P I - 9 蛋白質を発現させた腫瘍細胞株に対する H L A - A 2 4 拘束性の C T L を誘導することができた。

【0025】さらに、これらのペプチドの C T L 活性化作用を、<sup>51</sup> C r 遊離試験により標的細胞に対する傷害性を指標として、直接的に確認した。これら P I - 9 由来のペプチドで刺激した大腸癌患者から得た P B M C

は、HLA-A24<sup>+</sup> 腫瘍細胞を溶解 (lysis) した。また、食道癌患者から得たPBMCについても、上記同様の結果が得られた。従って、本発明のペプチドは、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞の誘導方法に使用可能である。また、本発明のペプチドは、該ペプチドを有効量含む腫瘍特異的細胞傷害性T細胞の誘導剤に使用してもよい。

【0026】PI-9由来のペプチドが癌患者のPBMCにおいてCTLを誘導することができたことから、PI-9由来のペプチドは腫瘍部位においてCTLにより認識される標的分子の一つであると言える。

【0027】本発明の4つのPI-9ペプチドは、癌患者のPBMC中のHLA-A24拘束性CTLを活性化することができ、PI-9mRNAは食道、胃、卵巣および口腔などの癌細胞株で検出できることが判明した。HLA-A24対立遺伝子 (allele) は日本人の人口の約60% (多くは、その95%の遺伝型がA2402である)、コーカサス人の20%、アフリカ人の12% (HLA 1991, Vol. 1:1065~1220, Oxford: Oxford Scientific Publications, 1992) で認められる。従って、本発明のペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。

【0028】(ペプチド) 本発明のペプチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列で示されるペプチドである。また、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列を含有するペプチドも、本発明のペプチドに含まれる。上記本発明のペプチドは、HLA-A2402拘束性CTLにより認識され、該CTLを活性化することができ、腫瘍抗原としての機能を有する。さらに本発明のペプチドは、この配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のペプチドと、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%をこえる相同性を有するペプチドであってもよい。この相同性をもつペプチドは、少なくともHLA-A2402拘束性CTLによる認識性の強さを指標にして選択することができる。また、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のペプチドと好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%をこえる相同性を有するペプチドのアミノ酸数は、HLA-A2402と結合して抗原提示細胞表面上に提示される数であり、かつCTLにより認識される腫瘍エピートプとしての性質を有する数であればよく、少なくとも約5個以上、好ましくは約7個以上、さらに好ましくは9個ないし10個である。

【0029】アミノ酸配列の相同性を決定する技術は自体公知であり、例えばアミノ酸配列を直接決定する方法、推定される塩基配列を決定後に該塩基配列に基づいて

これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等を用いることができる。

【0030】また、このように特定されたペプチドを元にして、少なくともHLA-A2402拘束性CTLによる認識性の強さを指標とすることにより、1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドも提供される。欠失、置換、付加、挿入などの変異あるいは誘発変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術 (Science, 219:666, 1983) を利用することができる。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0031】(ポリヌクレオチド) 本発明のポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のペプチド、これらのペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチド、これらのペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約70%のアミノ酸配列上の相同性を有するペプチド、および前記のペプチドのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加、挿入等の変異あるいは誘発変異を有するペプチド、ならびに配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個のアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖である。これらのポリヌクレオチドがコードするアミノ酸配列を有するペプチドは、HLA-A2402拘束性CTLにより認識され、該CTLを活性化することができ、腫瘍抗原としての機能を有する。さらに、本発明のポリヌクレオチドには、これらのポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも包含される。ポリヌクレオチド分子としてDNA分子を代表例にとると、「DNA分子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA分子」は、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual (コールドスプリングハーバーラボラトリー, 1989) 等に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、6×SSC、0.5% SDSおよび50%ホルムアミドの溶液中で42℃にて加温した後、0.1×SSC、0.5% SDSの溶液中で68℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。本発明のポリヌクレオチドは、いずれも本発明のペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。

【0032】また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のペプチドをコードする領域に対応する少なくとも約

15 個以上、好ましくは約 21～30 個以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドおよびその相補鎖であってもよい。この有用なポリヌクレオチドの選択および塩基配列の決定は、例えば公知の蛋白質発現系を利用して、発現ペプチドの確認を行うことにより可能である。

【0033】(形質転換体) 本発明は、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞、レトロウイルス等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなる新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドが提供可能である。本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドは、単純蛋白の状態でCTLによって認識されることが確認されており、遺伝子組換え技術による製造方法も、糖による影響を無視できるため、宿主の選択は生産性のみを考慮し容易にできる。本発明の具体例においては、動物細胞系を利用したが、無論これに限定されるものではない。

【0034】形質転換は、自体公知の手段が応用され、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換が行われる。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法があるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系が利用できる。ベクターは、選択した宿主の種類により選別され、発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。組合せは原核細胞、真核細胞によって分別され、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組合せて利用できる。

【0035】形質転換体は、自体公知の各宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養される。培養は、発現産生される新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドの生理活性、特にCTLによる認識性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養またはバッチ培養によって、生産される。

【0036】(化学合成) 本発明のペプチドは、通常のペプチド化学において知られる方法でも製造できる。例えば、ペプチド合成(丸善)1975年、“Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1996”が例示されるが、無論既知の方法が広く利用可能である。

【0037】(新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドの回収) 新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドの回収は、CTLによる認識性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を組合せるか、溶解度差に基づく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。より好ましくは、アミノ酸配列の情報に基づき、該アミノ酸配列に対する抗体を作製し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体によって、特異的に吸着回収する方法を用いる。

【0038】(抗体) 抗体は、本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドの抗原決定基を選別して用いて作製する。抗原決定基は、少なくとも5個、より好ましくは少なくとも8～10個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4に記載のアミノ酸配列と完全に相同である必要はないが、少なくともこのアミノ酸配列からなるペプチドが、CTLによる認識性を有するものであることが必要である。

10 【0039】抗体を産生するためには、新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドを、アジュバントの存在または非存在下で、単独または担体に結合して、動物に対して体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことによって行われる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得される。好ましい手段としては、免疫アフィニティークロマトグラフィー法である。

【0040】モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

【0041】かくして得られたポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、精製用抗体、試薬、標識マーカー等として利用できる。

30 【0042】(スクリーニング) 本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを免疫学的に認識する抗体は、単独または複数手段を組合せることによってCTLを活性化しうる物質のスクリーニングに有効な手段を提供する。スクリーニング方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。本発明のスクリーニング方法により、本発明のペプチドのCTLによる認識性を増強する化合物、本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物等を得ることができる。

40 【0043】(医薬組成物) 本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチド、これらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、該ポリヌクレオチドおよびその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションしうるポリヌクレオチド、これらのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき作製したベクター、該ベクターにより形質転換させた細胞、または本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドを免疫学的に認識する抗体、CTLによる認識性を増強

する化合物、本発明のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を増強する化合物、または該ペプチドからなる細胞傷害性T細胞誘導剤を、単独または複数組合せて利用することによって、これらを含む医薬組成物を提供する。

【0044】具体的には、例えば本発明の新規腫瘍抗原ペプチドおよびその由来物からなるペプチドは、いわゆる癌ワクチンとして使用される。癌ワクチンとして本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドを使用する場合、1つの腫瘍ペプチドのみでも癌ワクチンとして有効であるが、好ましくは複数の種類の腫瘍抗原ペプチドを組合せて使用することがよい。癌患者のCTLは複数の腫瘍抗原を認識する細胞の集団であるため、1種類の腫瘍抗原ペプチドを癌ワクチンとして使用するより複数の腫瘍抗原を組合せて癌ワクチンとして使用する方が、より高い効果が得られる。腫瘍抗原を組合せて使用する場合、本発明の腫瘍抗原ペプチドから選ばれるペプチドを組み合わせ使用してもよいが、これらから選ばれる少なくとも1つのペプチドに、公知の腫瘍抗原ペプチドから選ばれる少なくとも1つの腫瘍抗原ペプチドを組合せて使用してもよい。公知の腫瘍抗原ペプチドとしては、特願平11-222101号記載のlck遺伝子およびsrc遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド、SART-1遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド(Int. J. Cancer, 81:459~466, 1999)、SART-3遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド(Cancer Research, 59:4056~4063, 1999)、およびサイクロフィリンB遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチド(J. Immunol., 163:4994~5004, 1999)などが例示されるが、これらに限定されない。好ましくは、lck遺伝子およびsrc遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドは、TFDYLRSLV(Lck<sub>486-494</sub>)、DYLRSLVEDF(lck<sub>488-497</sub>)、TFEYLQAFLEDYF(src<sub>511-523</sub>)、TFEYIQSFLEDYF(yes<sub>508-520</sub>)、TFEYIQSVLDDFY(hck<sub>503-515</sub>)、TFEFLQSVLEDYF(blk<sub>482-494</sub>)から選ばれるものであり、SART-1遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドはEYRGFTQDF(SART-1<sub>690-698</sub>)であり、SART-3遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドはVYDYNCHVDL(SART-3<sub>109-118</sub>)またはAYIDFEMKI(SART-3<sub>115-123</sub>)であり、サイクロフィリンB遺伝子由来の腫瘍抗原ペプチドはKFHRVIKDF(Cyclophilin B<sub>84-92</sub>)またはDFMIQGGDF(Cyclophilin B<sub>91-99</sub>)である。

【0045】本発明の新規腫瘍抗原ペプチドおよびその由来物からなるペプチドを癌ワクチンとして使用する場合、細胞性免疫の賦活のために、適当なアジュバントの

存在または非存在下で、単独で用いるかまたは担体に結合して用いる。担体は、それ自体が人体に対して有害作用をおこななければ、特に限定されず例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミンなどが例示される。剤形は、自体公知のペプチド製剤の手段を応用して適宜選択できる。その投与量は、CTLによる認識性により変化するが、一般的には活性本体として0.01mg~100mg/日/成人ヒト、好ましくは0.1mg~10mg/日/成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

【0046】本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖は、癌の遺伝子治療のために有用である。これらポリヌクレオチドをベクターに担持させ、直接体内に導入する方法またはヒトから細胞を採取したのち体外で導入する方法があるが、いずれも利用できる。ベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス等が知られているが、レトロウイルス系が推奨される。無論これらウイルスは複製欠陥性である。その投与量は、CTLによる認識性により変化するが、一般的には本発明の腫瘍抗原ペプチドをコードするDNA含量として0.1μg~100mg/日/成人ヒト、好ましくは1μg~50mg/日/成人ヒトである。これを数日ないし数月に1回投与する。

【0047】(診断手段)診断手段としては、本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドの発現に関連した疾患(特に消化器系癌)の診断手段として有用であり、例えば当該ペプチドをコードしている核酸配列との相互作用および/または反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、当該ペプチドについて個体中の生体内分布を決定すること、当該ペプチドの存在を検出すること、および/または個体由来の試料中の存在量を決定すること、によって行われる。詳しくは、新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドを診断マーカーとして検定するのである。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR反応系等を利用すればよい。なお、ここでいう手段とは、目的達成のために使用する方法および/または媒体を意味する。すなわち、手段には、診断のための方法、診断に用いる試薬キットなどが含まれる。

【0048】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

#### 実施例 1

(PI-9遺伝子の同定) KE4腫瘍細胞のcDNAライブラリーから作製した合計10<sup>5</sup>個のクローンについて、VA13細胞にHLA-A2402と共にトランスフェクションし、CTLによるIFN-γの産生を増強する能力について試験した。この方法により、腫瘍抗原をコードする遺伝子の同定が可能である(J. Exp.

Med., 187:277~288, 1998)。

【0049】具体的には、エフェクターとしてのCTLとして、HLA-A2402拘束性腫瘍特異的細胞傷害性T細胞(KE4-CTL)を用いた。この細胞は食道癌患者から確立した(Int. J. Cancer, 81:457-466, 1999)。また、腫瘍抗原を取得するため、KE4腫瘍細胞を用い、そのポリ(A)<sup>+</sup>RNAをcDNAに変換してSalIアダプターと結合し、発現ベクターpSV-SPORT-1(GIBCO BRL)中に挿入した。HLA-A2402または対

照であるHLA-A0201のcDNAを、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって得て、真核生物発現ベクターpCR3(Invitrogen)中にクローン化した。プラスミドDNAプールまたはKE4cDNAライブラリーのクローン200ngと、HLA-A2402またはHLA-A0201cDNA200ngとを、OPTI-MEM(GIBCO BRL)70μl中でリポフェクション1μlと15分間混合した。

【0050】混合物の30μlを、ついで、VA13細胞(1×10<sup>4</sup>個)に添加し、5時間インキュベーションした。次に、10%のFCSを含むRPMI-1640培地200μlを加え、2日間培養した。その後、KE4-CTL(10<sup>4</sup>細胞/ウェル)を添加した。18

時間インキュベーション後、上清の100μlを回収し、既に報告した(J. Exp. Med., 187:277~288, 1998)ように、ELISAキットを用いてIFN-γを測定した。

【0051】1つのクローンが、HLA-A24拘束性KE4-CTLにより認識されることを見いだした。このcDNAクローンの塩基配列は2792塩基(bp)長であり、かつPI-9蛋白質のアミノ酸配列に対応するPI-9遺伝子の塩基配列であるポジション114-1244と100%相同性を有することが判明した。

#### 【0052】実施例2

(CTLにより認識される腫瘍抗原ペプチドの確認) HLA-A24分子に結合しうる、PI-9蛋白質由来の13種の異なるペプチドをC1R/A2402細胞に導入し、KE4-CTLによるIFN-γ産生を増強する能力について試験した。

【0053】HLA-A2402分子への結合能をもつ13種の異なるPI-9由来ペプチドは、HLA-A24に結合しうるペプチドのモチーフを文献検索により得、該モチーフに基づいて、PI-9遺伝子産物の376アミノ酸配列から、設計して合成した。合成したペプチドのアミノ酸配列を表1に示す。

#### 【0054】

【表1】

ペプチド	アミノ酸配列
PI9-1	MYQEATFKL
PI9-2	FYHAELKEL
PI9-3	RFCADHPFL (配列番号1)
PI9-4	AFQQGKADL (配列番号2)
PI9-5	PYARKELSL
PI9-6	KSTEVEVLL
PI9-7	TFKESCLQF
PI9-8	QYLLRTANRL (配列番号3)
PI9-9	TYTREMPFKI
PI9-10	LFGEKTCQFL
PI9-11	TFAIRLLKIL (配列番号4)
PI9-12	KTEGKIEELL
PI9-13	YFKGKWNEPF

【0055】腫瘍抗原性を有するペプチドの検出のために、HLA-A2402をトランスフェクトしたC1R/A2402細胞(1×10<sup>4</sup>個)を、終濃度10μMの各ペプチドと2時間パルスした。ついで、CTL(1×10<sup>4</sup>個)を加え、18時間インキュベーションした。上清の100μlを回収し、ELISAによりIFN-γを測定した。用いたCTLは、親株であるHLA-A2402拘束性KE4-CTLから、1または10細胞/ウェルで限定希釈培養(limiting dil

ution culture)して確立した(J. Exp. Med., 187:277~288, 1998)3種類の亜株(subline)である。結果を図1に示す。

【0056】13種類のペプチドはいずれも、3種類のKE4-CTL亜株の少なくともいずれか1種類からのIFN-γ産生を増強した。特に4つのペプチド、PI9-3(RFCADHPFL; 配列番号1)、PI9-4(AFQQGKADL; 配列番号2)、PI9-8

(QYLLRTANRL ; 配列番号 3) および P I 9 - 11 (TFAIRLLKIL ; 配列番号 4) は、検討に用いた複数の CTL 亜株において、強い CTL 活性化作用を示した。一方、陰性対照として用いた HIV 由来の HLA-A24 結合モチーフを有するペプチドでは、IFN- $\gamma$  産生は全く見られなかった。また、これら 4 つのペプチドのうち P I 9 - 3 および P I 9 - 4 の CTL 活性化作用は、濃度依存的であり、それぞれ 10 nM、1  $\mu$ M 程度で認められた (図 2)。

#### 【0057】実施例 3

(ペプチドによる細胞傷害性 T 細胞の誘導) P I 9 - 3 (配列番号 1) および P I 9 - 4 (配列番号 2) について、P I - 9 蛋白質を発現している腫瘍細胞株 (KE4 (HLA-A24<sup>+</sup>)、SW480 (HLA-A24<sup>+</sup>) および COLO201 (HLA-A24<sup>-</sup>)) を用いて、大腸癌患者由来の PBMC から HLA-A24 拘束性 CTL を誘導しうるか試験した。

【0058】HLA-A24<sup>+</sup> 大腸癌患者 PBMC (2  $\times$  10<sup>6</sup> 個) を、培養培地 (45% RPMI-1640 培地、45% AIM-V<sup>R</sup> (登録商標) 培地 / GIBC 20 OBRL、100 U/ml の IL-2、0.1 mM の MEM ノンエッセンシャルアミノ酸溶液 / GIBCO BRL、および 10% FCS を含む) 2 ml を含む 24 ウェルプレートの各ウェル中で、各ペプチド 10  $\mu$ M とインキュベーションした。

【0059】培養 7 日目と 14 日目に細胞を回収して洗浄し、放射線照射 (50 グレイ) した自己由来 PBMC をペプチドでパルスして得られる抗原提示細胞 (APC) で、該回収した細胞を刺激した。細胞は培養 21 日目に採取し、直ちに種々の標的細胞と反応させ、IFN- $\gamma$  の産生量を ELISA 法で調べた。 30

【0060】大腸癌患者から得た PBMC は、P I 9 - 3 (配列番号 1) および P I 9 - 4 (配列番号 2) を用いて刺激した場合、HLA-A24<sup>+</sup> 腫瘍細胞 (KE4 および SW480) と反応させると IFN- $\gamma$  産生が増強されるが、HLA-A24<sup>-</sup> 腫瘍細胞 (COLO201) と反応させても IFN- $\gamma$  産生は増強されなかった (図 3)。

#### 【0061】

【発明の効果】本発明の新規腫瘍抗原およびその由来物 40 からなるペプチドは、癌患者由来の PBMC において HLA-A24 拘束性の CTL を活性化することができる。また、新規腫瘍抗原 P I - 9 mRNA は食道癌などの細胞株で検出された。HLA-A24 対立遺伝子 (allele) は日本人の人口の約 60% (多くは、その 95% の遺伝型が A2402 である)、コーカサス人の 20%、アフリカ人の 12% で見られる。従って、新規腫瘍抗原およびその由来物からなるペプチドは比較的多数の癌患者における特異的免疫治療に適用しうる。かくして本発明で提供されるペプチド、これをコードするボ 50

リヌクレオチド、抗体は、癌の治療および診断の分野で、極めて有用な手段を提供する。また、本発明の腫瘍抗原ペプチドは、既に報告されている腫瘍抗原ペプチドと組合せて使用することにより、複数の腫瘍抗原を認識する細胞集団である癌患者の CTL の活性化、ならびに癌の多様性に対応することができるため、その有用性は高い。

【0062】

【配列表】

## Sequence Listing

&lt;110&gt; Itoh, Kyogo

&lt;120&gt; Tumor Antigen

&lt;130&gt; NP00-1160

&lt;160&gt; 4

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Arg Phe Cys Ala Asp His Pro Phe Leu

1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Ala Phe Gln Gln Gly Lys Ala Asp Leu

1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Gln Tyr Leu Leu Arg Thr Ala Asn Arg Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Thr Phe Ala Ile Arg Leu Leu Lys Ile Leu

1 5 10

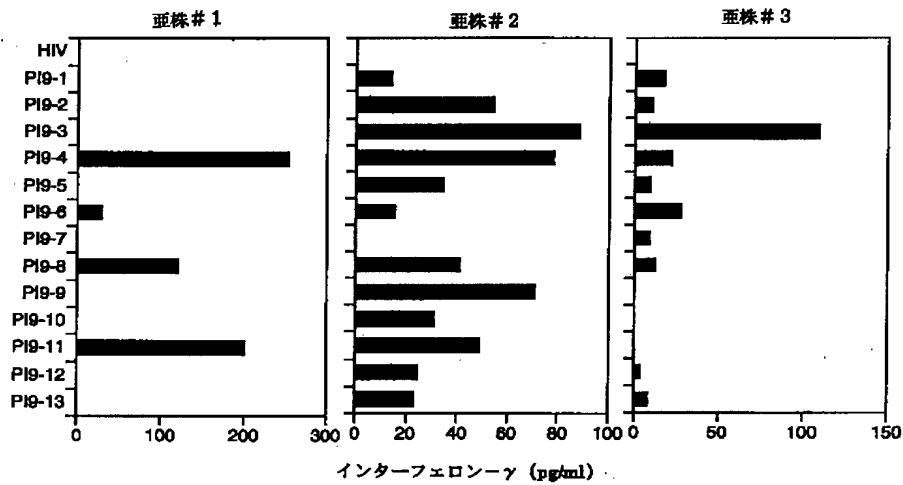
【図面の簡単な説明】

【図1】 HLA-A24結合モチーフを有するPI-9由来ペプチドが、KE4-CTLの3種類の亜株を活性化することを示す図である。該活性化の指標としてIFN- $\gamma$ の産生量を測定した。図中、HIVは、陰性対照であるHIV (Human Immunodeficiency Virus) 由来のペプチドを表す。図中、PI9-1~PI9-13は、PI9由来の各ペプチドを表す。

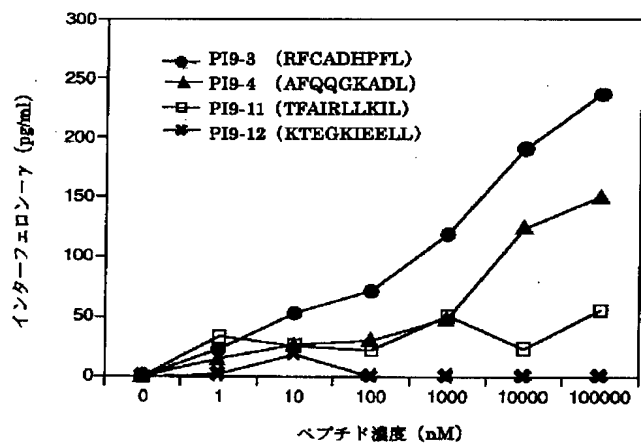
【図2】 HLA-A24結合モチーフを有するPI-9由来ペプチドが、KE4-CTLを濃度依存的に活性化することを示す図である。図中、-●-はPI9-3、-▲-はPI9-4、-□-はPI9-11、-×-はPI9-12を表す。

【図3】 HLA-A24結合モチーフを有するPI-9由来ペプチドが、大腸癌患者由来の末梢血単核球(PBMC)のHLA-A24拘束性CTLを活性化することを示す図である。図中、AはKE4 (HLA-A24<sup>+</sup>) 細胞、BはSW480 (HLA-A24<sup>+</sup>) 細胞、CはCOLO201 (HLA-A24<sup>-</sup>) 細胞、DはV A13細胞を表す。

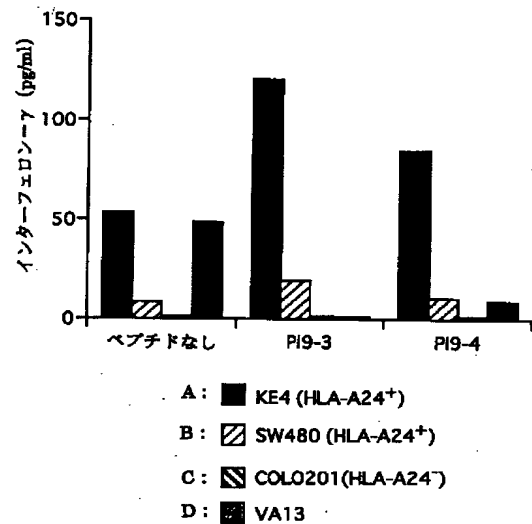
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00		A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 35/00		C 0 7 K 14/47	
43/00	1 0 5	16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	C
1/21		C 1 2 Q 1/02	
5/10		1/68	A

C 1 2 P 21/02  
C 1 2 Q 1/02  
1/68  
G 0 1 N 33/15  
33/50  
  
33/53  
33/574

G 0 1 N 33/15  
33/50  
  
33/53  
33/574  
C 1 2 N 15/00  
A 6 1 K 37/02  
C 1 2 N 5/00

Z  
K  
T  
Z  
D  
A  
Z N A A  
A